

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 16 MAR 2004
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 60 556.4

Anmeldetag: 21. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Erkennen von Karzinomen

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY



Verfahren zum Erkennen von Karzinomen und Testkit zur Durchführung des Diagnoseverfahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erkennen von Karzinomen, insbesondere von Tumoren im Uterus, und einen Testkit zur Durchführung des Verfahrens. Sie betrifft weiterhin ein Verfahren zur Bestimmung maligner Transformation von Zellen und seiner Nutzung für die Diagnosestellung und Einschätzung eines Tumors und zur Bestätigung einer Tumorprognose.

Es ist bereits bekannt, humanes Choriongonadotropin (hCG) als Krebsmarker zu nutzen. Dem liegt die Erkenntnis zugrunde, daß hCG als ein natürliches Hormon des menschlichen Körpers im Schwangerschaftstest nachgewiesen wird. Liegt eine Schwangerschaft vor, deutet eine erhöhte hCG-Konzentration auf eine Krebs-erkrankung hin.

Das der Erfindung zugrunde liegende hCG-Hormonmolekül ist ein Glykoprotein, bestehend aus zwei Untereinheiten α CG und β hCG in nichtkovalenter Bindung (1). Während der Schwangerschaft sezerniert der Trophoblast größere Mengen hCG-Dimer und freie α CG- und β hCG-Moleküle in das Blut. Aber auch in einigen nicht-trophoblastären Geweben gesunder Menschen wird hCG und/oder seine Untereinheiten in geringen Mengen exprimiert (2-6). Deshalb können im Serum hCG-Konzentrationen von hCG bis 1000 pg/ml und von β hCG bis 100 pg/ml in nicht-schwangeren gesunden Personen beobachtet werden (7, 8). Höhere β hCG-Werte deuten auf einen gonadalen oder nicht-gonadalen Tumor hin und kennzeichnen eine ungünstige Prognose, wie bei Lungen-, Blasen-, Prostata-, Colon-, Nierenzell- und Mammakarzinom beschrieben (5, 9-13). Während das α CG-Molekül durch ein einziges Gen auf dem Chromosom 6q21.1-q23 codiert wird, wird β hCG durch sechs nicht-allele Gene β hCG 8 (β 8), β 7, β 5, β 3, β 1 und β 2 als einem Gencluster auf dem Chromosom 19q13.3 codiert. Ein weiteres

β hCG-Gen β 6 ist ein Allel von β 7 mit Differenzen in der 5'-nichttranslatierten Sequenz des Promotorgens (Exon 1 des β hCG). Nur die Gene β 8, β 7, β 6, β 5 und β 3 codieren ein β hCG-Proteinmolekül von 145 Aminosäuren (Exon 2 und Exon 3).

Während $\beta 5$, $\beta 8$, und $\beta 3$ an Position 117 (Exon 3) der Aminosäuresequenz Aspartat (Asp) codiert, bildet $\beta 7$ und $\beta 6$ dort Alanin (Ala). Die Gene $\beta 1$ und $\beta 2$ können zwar auch in einigen Geweben transkribiert werden, codieren aber ein Protein von nur 132 Aminosäuren mit unterschiedlicher Sequenz zum β hCG (14-16).

Während im Trophoblast fast ausschließlich hCG $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ exprimiert und translatiert wird, wird in einigen normalen, nicht-trophoblastären Geweben (Mamma, Lunge, Prostata, Skelettmuskulatur, Blase, Colon, Uterus u. a.) nur hCG $\beta 7$ und $\beta 6$ in geringem Level translatiert (17). Andererseits scheint im neoplastischen Trophoblast jetzt verstärkt hCG $\beta 7$, $\beta 6$ und in einigen neoplastischen nicht-trophoblastären Geweben zusätzlich hCG $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ exprimiert zu werden.

In der Vergangenheit sind verschiedene Studien mit dem Ziel durchgeführt worden, die β hCG-Transkripte in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben nicht trophoblastärer Herkunft teils in semiquantitativer Methode nachzuweisen (5, 11, 12, 18). Diese Methoden zeigen, daß $\beta 7$, $\beta 5$, $\beta 8$ und $\beta 3$ in normaler Plazenta (19), normalen Testes (6), aber auch neoplastischen Testes (20) und neoplastischem Blasengewebe (21) transkribiert, aber zwischen $\beta 7$ sowie $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ in den verschiedenen Studien nicht unterschieden wird.

In einer Arbeit (9) wird die Anwesenheit von $\beta 7$ im normalen und von $\beta 8$, $\beta 5$, $\beta 3$ in malignem Vesikelgewebe durch spezifische Restriktionsenzyme für die Erkennung einzelner Transkripte nachgewiesen.

Eine weitere Arbeit bestimmt die Überexpression von $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ im maligne transformierten nicht-trophoblastären Gewebe durch den ermittelten Transformationsindex, bestehend im Verhältnis zwischen der Expression von $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ zur Gesamtexpression aller β hCG-Gene im selben Gewebe. Er wird mit Primern zwischen Exon 2 und Exon 3 erfaßt, die die Punktmutation C117 in der C-terminalen Region des β hCG im Exon 3 erkennt (17). Bisher wird diese Punktmutation Asp - Ala in Position 117 der β hCG-Aminosäure-Ketten im genannten Quotient als diagnostischer Parameter der neoplastischen Transformationen genutzt.

Tumoidentifizierung durch Analyse der Sekretionsprodukte, insbesondere der

Nutzung des hCG als Indikator für eine Krebskrankung, zeigt eine französische Arbeitsgruppe bereits 1996. Beschrieben wird von Bellet et al. (Cancer Research 57, 516-23, February 1, 1997), daß die β -Kette von hCG durch vier nicht-allele β hCG-Gene codiert wird. Zu den wesentlichen Erkenntnissen gehört, daß die maligne Transformation nicht-trophoblastären Gewebes stets mit der Expression von hCG β -Genen verbunden ist, die im Trophoblast normal transkribiert werden. Die Erforschung der β hCG-Gene, die durch nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert werden, führt zu dem Ergebnis: normales nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert nur β hCG-Gene vom Typ I (hCG β 7, β 6), während nach maligner Transformation auch β hCG-Gene vom Typ II (hCG β 7, β 6) exprimiert wird. Der dazu verwendete CG117-Assay ist empfindlich genug, spezifisch eine auch nur geringe Menge vom β hCG-Transkript des Typs II zu erkennen, wodurch es möglich ist, Tumorgewebe im Umfeld von normalem Gewebe zu identifizieren.

In US-PS 6,194,154 wird ein Verfahren zur Bestimmung der malignen Transformation humaner Zellen beschrieben, das die Überexpression von β 3, β 5, β 8 und β 9 mRNA, welche die hCG- β -Kette codieren, mit deren Expression von β 7, β 6 in nicht-malignen Zellen vergleicht. Bestimmt wird auch die Steigerung der mRNA-Expression von β 3, β 5, β 8 und β 9-Genen im Verhältnis zur Gesamt- β -Genexpression in den malignen Zellen. Weiterhin wird ausgeführt, daß die Punktmutation in der mRNA-Nukleotidsequenz Position 775 für β 5, β 8, β 3 ein A und für β 7, β 6 ein C anzeigt und in der Aminosäureposition 117 somit Aspartat oder Alanin codiert. Auf dieser Basis baut sich ein Testkit auf, der Verbreitung gefunden hat.

WO 0190344 nimmt Bezug auf den Promotor, Enhancer und andere Regulatoren, welche die Expression des Proteins β hCG im testikulären Carcinom kontrollieren. Weiterhin erfolgen Ausführungen zur Gentherapie unter Einschleusung von Promotoren- β hCG-DNA in verschiedene Zellen, z.B. in Liposomen. Das β hCG-Protein wird in verschiedenen Tumorgeweben als diagnostischer Parameter verwendet. Die Erfindung liefert ein Modell für tumorspezifische Gentranskription speziell eines neuen Promotors β hCG, der nur in verschiedenen Tumorgeweben aktiviert wird, einschließlich, aber nicht begrenzt auf das testikuläre Karzinom. Die Erfindung schließt die Analyse tumorspezifischer Aktivität durch Reportergene (Promotor-

sequenz mit Reportergen wie Fluoreszin o.dgl.) ein.

Trotz intensiver Anstrengungen der Forschung ist es bisher nicht befriedigend gelungen, eine zuverlässige Diagnose eines Uteruskarzinoms zu stellen, die eine falsch-Ja-Entscheidung vermeidet. Der im Handel befindliche Testkit sichert dies nicht ausreichend.

Der bekannte Testkit beruht auf der Detektion einer einzigen Aminosäure in Position 117, in der Alanin gegen Aspartat ausgetauscht ist.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Tumordiagnostik anzugeben, das zuverlässig arbeitet, den Patienten nur gering belastet und einfach und schnell in seiner Durchführung ist.

Die Erfindung hat die Aufgabe, einen tumorspezifischen Indikator aufzufinden und zu detektieren, der den Nachweis einer Krebserkrankung mit geringer Fehlerquote ermöglicht. Ein Testkit soll die Durchführung der Bestimmung sichern.

Es wurde gefunden, daß in einigen neoplastischen nicht-trophoblastären Geweben verstärkt hCG β 5, β 8, β 3 und im neoplastischen Trophoblast zusätzlich hCG β 7, β 6 exprimiert werden.

Der Erfindung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, daß ein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein und das Wachstum von Tumorzellen die Bewertung des Anteils exprimierter 5'-nichttranslatierenden Promotorsequenzen des β hCG (Exon 1) von β hCG-Gen β 7, β 6 zu β 5, β 8, β 3 darstellt, die sich in diesem Genausschnitt in einer Vielzahl von Nukleotiddifferenzen unterscheiden.

Im Unterschied zur Mutation eines einzigen Nukleotides im Codon 117 des vorbeschriebenen C117-Assays (Exon 3) differieren die β hCG-Gene β 7, β 6 zu denen von β 5, β 8, β 3 in diesem Genabschnitt des β hCG-Promotorgens (Exon 1) in einer hohen Anzahl von Nukleotiden, zwischen Gen 5 und Gen 7 mit n=20 und mit den gewählten Primern n=12. Außerdem wird mit dem einbezogenen Exon 1 der möglicherweise verfälschende Anteil der Genexpression hCG β 1 und β 2 für die

Gesamtexpression aller β hCG-Gene verhindert (22).

Die Erfindung wird durchgeführt, wie in Anspruch 1 beschrieben. Sie wird nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf dieses beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel 1

Dem Patienten wird zur Diagnostik Gewebe entnommen und in Flüssigstickstoff gelagert. Zur Analyse wird nach Ultra Turrax-Gewebehomogenisierung eine Trizol- RNA-Extraktion durchgeführt, nachfolgend eine RT-PCR am Thermocycler mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar. Die Gesamt- β hCG-Expression β 5, β 8, β 3 und β hCG β 7, β 6 über Exon 1, Exon 2 und Exon 3 wird erfaßt (Primer 1 und 2). Es schließt sich eine nested PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den β hCG β 7, β 6- und den β hCG β 5, β 8, β 3-Anteil an (Primer 4 und 2 resp. Primer 3 und 2). Die Fluoreszenzmessung der cDNA-Amplifikate erfolgt am DNA-Sequencer ABI 373A oder vergleichbaren Geräten.

Die quantitative Auswertung mit der Software Genescan 672 Fragment Analysis bildet den Quotienten aus hCG β 5, β 8, β 3 zu hCG β 7, β 6 plus hCG β 5, β 8, β 3. Eine Quotient nahe 0 zeigt Normalgewebe an, ein Quotient > 0 bis 1 weist auf neoplastisches Gewebe hin.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die Anwesenheit von hCG β 5, β 8, β 3 der Indikator für eine Tumorerkrankung darstellt. Das Vorhandensein von hCG β 6 und β 7 zeigt das Gegenteil an: eine nicht-trophoblastäre Tumorerkrankung kann ausgeschlossen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Fakt, daß mit der β hCG-Diagnostik aggressive Tumore erkannt werden, so daß die Diagnose einen Therapiehinweis gibt. Zu beachten ist, daß hCG β 6 im wesentlichen durch hCG β 7 repräsentiert wird (vier Nukleotiddifferenzen im Exon 1). Die Untersuchungen werden vorteilhaft im Endometrium durchgeführt, um hier Karzinome frühzeitig zu erkennen. Die Gewebeproben können analog der der Methode der fraktionierten Abrasio gewonnen werden.

Ausführungsbeispiel 2

Tumorgewebe (50 - 200 mg) wird sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Für die Untersuchung der drei exprimierten Anteile hCG β 8, β 5, β 3 und hCG β 7, β 6 sowie Gesamt- β hCG wird die Total-RNA mit Trizol extrahiert und etwa 1 μ g der RNA für 60 min bei 42° C unter Standardbedingungen und Einsatz von Oligo-dT(15)-Primer reverse-transkribiert.

Zur quantitativen Bestimmung der drei obengenannten β hCG-Expressionsanteile wird die Real time-PCR am Light Cycler (Roche) oder vergleichbaren Geräten anderer Firmen für die Amplifikation der Tumor-cDNA eingesetzt. Für die Synthese der RNA-Standards der drei β hCG-Expressionsanteile β 8, β 5, β 3 sowie β 7, β 6 und Gesamt- β hCG werden die drei Kalibrationsfragmente unter Standard-PCR-Bedingungen aus Tumor-cDNA amplifiziert. Dafür werden wieder die drei genannten, jetzt unmarkierten β hCG Typ II-, β hCG Typ I- und Gesamt- β hCG-spezifischen forward- β hCG-Primer (Primer 1, 3 und 4) mit dem gemeinsamen reverse- β hCG-Primer (Primer 2) benutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im Plasmid-Vector pGEM-T geklont. Unter Verwendung der T7- und Sp6-Promotoren der pGEM-T-Vectors dient das Plasmid als Template für die in vitro-Bildung von RNA entsprechend des Herstellerprotokolls. Die gebildeten Standard-RNA werden gereinigt und seine Konzentration vermessen.

Die Real time-PCR-Amplifikation am Light Cycler (Roche) bestimmt die Anzahl gebildeter Genkopien für die zwei genspezifischen β hCG-Expressionsgruppen Typ II (β 8, β 5, β 3) und Typ I (β 7, β 6) sowie Gesamt- β hCG im Tumorgewebe und in den RNA-Standards. Die PCR-Reaktion erfolgt im 20 μ l-Reaktionsvolumen in den Endkonzentrationen von 1 x PCR-Puffer von 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 200 μ M dNTPs, mit 0,5 μ M der jeweils spezifischen forward- und reverse- β hCG-Primer, 4-5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq Polymerase, SYBR Green I mit 1:3000 der Stammlösung (Molecular Probes) und 1 μ l der Templates (Tumor-cDNA oder Standards bekannter Konzentration).

Die Erfindung beansprucht auch die Real time-Messung als one tube-RT-PCR oder die Verwendung anderer Methoden zur quantitativen Erfassung der Expression

spezifischer Genkopien neben SYBR Green I, wie zum Beispiel der Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben mit unterschiedlichen Farbstoff- oder Fluoreszenzmarker-Anbindung (TaqMan, FRET, Beacon).

Ausführungsbeispiel 3

Nutzung von Methoden: Gewebeentnahme zur Diagnostik, Lagerung in Flüssigstickstoff, RNA-Extraktion (23), RT-PCR mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar, Erfassung der Gesamt- β hCG-Expression β 5, β 8, β 3 und β 7, β 6 über Exon1, Exon 2 und Exon 3, nested PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den β 7, β 6- und β 5, β 8, β 3-Anteil; quantitative Auswertung als Quotient von β 5, β 8, β 3-Anteil zu β 7, β 6- plus β 5, β 8, β 3-Anteil für die Bewertung des neoplastischen nicht-trophoblastären Gewebes, Ergebnis 0 bei Normalgewebe und Ergebnis > 0 bis 1 bei neoplastischem Gewebe im Ausführungsbeispiel 1; absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen β hCG-Amplifikate β 5, β 8, β 3 sowie β 7, β 6 und Gesamt- β hCG nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu β hCG-sequenzspezifischen Kalibratoren für die Bewertung des normalen und neoplastischen Gewebes im Ausführungsbeispiel 2.

Nutzung von Geräten und Material: Gewebe in Flüssigstickstoff, Ultra Turrax-Gewebehomogenisation, Trizol-RNA-Extraktion, RT-PCR am Thermocycler, Fluoreszenzmessung des cDNA-Amplifikates am DNA Sequencer ABI 373A, Software Genescan 672 Fragment Analysis zur Auswertung, Flüssigstickstoff, Trizol, DNA-Synthese-Kit, PCR-Amplifikationskit, β hCG-Primer für Gesamt- β hCG-Amplifikation und nested PCR für β 5, β 8, β 3 und β 7, β 6, zum Teil fluoreszenzmarkiert.

Beschreibung der Methode für Ausführungsbeispiel 1:

Extraktion der Gesamt-RNA: Das Gewebematerial wird sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gesamt-RNA wird mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (24) extrahiert, die gewonnene RNA spektralphotometrisch bei 260 nm / 280 nm quantifiziert, sofort weiterbearbeitet oder bei - 80° C gelagert.

Auswahl der Oligonukleotidprimer: Die in Abb. 1 aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden derart ausgewählt, daß sie unter Verwendung der Gesamt-RNA und der RT-PCR Methode in einem ersten Amplifikationsschritt die gesamten β hCG Transkripte β 5, β 8, β 3 und auch β 7, β 6 in gleicher Effizienz darstellen. Die gewählten Primer 1 und Primer 2 schließen die β LH-Amplifikation wegen eines differenten Nukleotid-Triplets aus. Im folgenden nested PCR-Schritt wird unter Verwendung von Primer 3 und Primer 2 das Transkript β 5, β 8, β 3 und mit Primer 4 und Primer 2 das Transkript β 7, β 6 amplifiziert.

Reverse-Transkription: 1 μ g Gesamt-RNA wird in einem Reaktionsmix mit dem Gesamtvolumen von 5 μ l nach der Standardmethode transkribiert: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1mM jedes dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 200 μ g Oligo dT-Primer pdT15, 12,5 U RNase Inhibitor, 2,5 U AMV-Revertase.

Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 25 °C (Hybridisierung des Primers), 30 min bei 42 °C (Reversetranskription) und 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Revertase und des RNase-Inhibitors) sowie Abkühlen auf 4 °C.

PCR-Amplifikation der gesamten β hCG-Transkripte: Zum cDNA-Produkt wird im selben Tube der PCR-Mix von 20 μ l im Gesamtvolumen von 25 μ l für die Amplifikation des Gesamt- β hCG-Transkriptes zugegeben: Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 5 pmol Primer 1, 5 pmol Primer 2 und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen sind nach vorheriger 3 min-Inkubation bei 95 °C dann 30 sec 95 °C, 30 sec 65 °C, 60 sec 72 °C für 35 Zyklen mit abschließenden 7 min bei 72 °C und schnellem Abkühlen auf 4 °C.

Nested PCR nach der COP-Methode für β hCG β 7, β 6- und β 5, β 8, β 3-Transkripte: 2 μ l des 1:10.000 verdünnten PCR-Produktes werden zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l in ein PCR-Mix mit dem Endvolumen von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 50 μ M dNTP, 0,1pmol Primer 2, 0,1 pmol Primer 3, 0,1 pmol des Primers 4 und 2 U Stoffel-Fragment Taq DNA Polymerase zugefügt. Die COP-Reaktion wird über 5 Zyklen an Thermozykler für je 30 sec bei 95 °C und 30 sec bei 65 °C durchgeführt.

Das erhaltene Produkt enthält die zwei Amplifikationsprodukte für β hCG β 5, β 8, β 3 und β 7, β 6 mit je einem differenten Fluoreszenzmärker für Primer 3 und Primer 4, und beide Transkripte enthalten zusätzlich einen dritten gemeinsamen Fluoreszenzmarker des Primers 2.

Für die Analyse am DNA Sequenzer (Perkin-Elmer-Modell 373A) werden 2,5 μ l des Produktes mit 2 μ l Loading buffer und 0,5 μ l Genescan Size Marker und der Elpho bei 8% Acrylamid, 6 M Harnstoff und TBE-Puffer für 1 Stunde unterzogen.

Die Ergebnisse werden mit der GeneScan 672 Software (Perkin-Elmer) analysiert unter Verwendung der ermittelten Fluoreszenzen für Gesamt- β hCG-Transkripte und den β 7, β 7- sowie β 5, β 8, β 3-Fragmenten.

Der Transkriptionsindex wird, wie bei Bellet et al. (17) beschrieben, nach dieser Methode als Quotient von β hCG β 7, β 6 zur Summe von β hCG β 7, β 6 und β 5, β 8, β 3 errechnet.

Die vorgestellte Erfindung bringt eine Reihe wesentlicher Vorteile mit sich. Die erhaltenen Ergebnisse gewinnen an Zuverlässigkeit, weil es mehrere Ansatzpunkte für den Indikator gibt. Im Unterschied zu der bekannten technischen Lösung, die ausschließlich auf die Punktmutation 117 in Exon 3 abstellt, bezieht unsere Lösung Exon 2 und ein Promotorgen ein. Unser Verfahren ermöglicht eine Unterscheidung in bösartige und in gutartige Tumore mit den gewünschten Folgen für einen Therapieansatz. Das basiert auf der Erkenntnis, daß der Grad der Bösartigkeit eines nicht-trophoblastären Tumors durch die Anwesenheit von hCG β 5, β 8, β 3 indiziert wird.

Dessen Konzentration wird im Ausführungsbeispiel 1 als Fluoreszenzwert gemessen und zu hCG β 5, β 8, β 3 in Beziehung gesetzt, indem der Quotient von hCG β 5, β 8, β 3 zur Summe von hCG β 5, β 8, β 3 plus hCG β 6, β 7 gebildet wird.

Im Ausführungsbeispiel 2 wird die Anwesenheit von hCG β 5, β 8, β 3 durch Real time-RT-PCR durch die Kopienzahl seiner Genexpression im Vergleich zur sequenzspezifischen β hCG-Standardreihe wie auch von hCG β 7, β 6 absolut quantifiziert.

Zur Durchführung des Verfahrens nach Ausführungsbeispiel 1 ist ein Testkit geschaffen, der die folgenden Bestandteile enthält:

Reaktionslösungen	Ingredienzien
1. Primer 1	nicht-markierter Primer 1
2. Primer 2	fluoreszenzmarkierter Primer 2
3. Primer 3	fluoreszenzmarkierter Primer 3
4. Primer 4	fluoreszenzmarkierter Primer 4
5. RT-Reaktionsmix	RT-Reaktionspuffer mit dNTPs, Oligo-pdT15, RNase-Inhibitor für cDNA-Bildung
6. Reverse Transkriptase	Stammlösung für RT
7. PCR-Reaktionsmix	PCR-Reaktionspuffer
8. PCR-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase
9. nested PCR-Reaktionsmix	nested PCR-Reaktionspuffer

Das Verfahren nach Ausführungsbeispiel 2 wird mit einem Testkit durchgeführt, der die folgenden Bestandteile enthält:

Reaktionslösungen	Ingredienzien
1. Primer 1	nicht-markierter Primer 1
2. Primer 2	fluoreszenzmarkierter Primer 2
3. Primer 3	fluoreszenzmarkierter Primer 3
4. Primer 4	fluoreszenzmarkierter Primer 4
5. RT-Reaktionsmix	RT-Reaktionspuffer mit dNTPs, Oligo-pdT15, RNase-Inhibitor für cDNA-Bildung
6. Reverse Transkriptase	Stammlösung für RT
7. PCR-Reaktionsmix	PCR-Reaktionspuffer
8. PCR-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase
9. nested PCR-Reaktionsmix	nested PCR-Reaktionspuffer

Der mRNA-Quantifizierungskit für β hCG gene $\beta 5$, $\beta 7$ gestattet die hochempfindliche und spezifische Bestimmung der Genexpression von β hCG im normalen und Tumorgewebe für die Diagnostik und Therapiekontrolle.

Die mit den Methoden der Real time-RT-PCR amplifizierten spezifischen β hCG $\beta 5$ - und β hCG $\beta 7$ -Kopien können über einen breiten Meßbereich mit je einem Satz bereitstehender Kalibrationsstandards von β hCG $\beta 5$ - und β hCG $\beta 7$ -mRNA erfaßt werden.

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO 1

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Erkennen von Karzinomen

<130>

<160> 4

<210> 1

<211> 7

<212> DNA

<213> β hCG ges

<221>

<301> Lindholm-Miller, A.K., Labenz, C.J., Ramey, J., Bedows, E., Ruddon, R.W.,

<302> Human Chorionic Gonadotropin- β -Gene Expression in First Trimaster Placenta

<303> Endocrinology 138 (1997) 5459-5465

<304> 138

<305> 12

<306> 5459-5465

<307>

<308>

<400> 1

5'-TCA CTT CAC CGT GGT CTC C -3'

SEQ ID NO.2

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Erkennen von Karzinomen

<130>

<160> 4

<210> 2

<211> 8

<212> DNA

<213> β hCG ges

<221>

<301> Lindholm-Miller, A.K., Labenz, C.J., Ramey, J., Bedows, E., Ruddon, R.W.,

<302> Human Chorionic Gonadotropin- β -Gene Expression in First Trimaster Placenta

<303> Endocrinology 138 (1997) 5459-5465

<304> 138

<305> 12

<306> 5459-5465

<307>

<308>

<400> 2

5'- NED - TGC AGC ACG CGG GTC ATG GT -3' β hCG ges:

SEQ ID NO 3

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Erkennen von Karzinomen

<130>

<160> 4

<210> 3

<211> 8

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 5\beta 8\beta 3$

<221>

<400> 3

5'- HEX- GGA CCA GTC AGA GGA GAG GG – 3'

SEQ ID NO 4

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Erkennen von Karzinomen

<130>

<160> 4

<210> 4

<211> 8

<212> DNA

<213> β hCG $\beta 7\beta 6$

<221>

<400> 4

5' 6FAM - AGA CCA CTG AGG GGA GAG GA - 3'

Universitätsfrauenklinik der Universität Leipzig
Forschungslabor Humane Reproduktion und Endokrinologie

Transkriptionsstart ShCG
 LH4 G ** C T C C
 CG5 CTT CAA TCC AGC ACT TTG CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGC TCC
 CG6 CTT CAG TCC AGC ACT TTC CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGT TCC
 CG7 CTT CAG TCC AGC ACT TTC CTC GGG TCA CGG CCT CCT CCT GGT TCC
 Endo CCT GGT TCC

LH4	A	A	T																	
CG5	CAG	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	CCT	GTG	CCT	CCA	GGC
CG6	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC
CG7	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC
Endo	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC

LH4	G	A	T	Primer 1	T
CG5	TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT <u>CTG</u> AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC				
CG6	TCG ACT AGT CCC TAA CAC TCG ACG ACT GAG TCT CAG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC				
CG7	TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT CAG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC				
Endo	TCG ACT AGT CCC TAG CAC TCG ACG ACT GAG TCT CAG AGG TCA CTT CAC CGT GGT CTC CGC				

LH4	C	TC	A	C	G	G	Primer 3	G	C	A		
CG5	CTC	<u>ACC</u>	<u>CTT</u>	GGC	GCT	<u>GGC</u>	<u>CCA</u>	<u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u>	<u>GGC</u>	<u>GAC</u>	<u>GGC</u>	
CG6	CTC	ATC	<u>CTT</u>	GGC	GCT	AGA	CCA	CTG	AGG	GGA	GAG	GAC
CG7	CTC	ATC	<u>CTT</u>	GGC	GCT	<u>AGA</u>	<u>CCA</u>	<u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u>	<u>GGA</u>	<u>GAC</u>	<u>GAC</u>	
Endo	CTC	ATC	<u>CTT</u>	GGC	GCT	AGA	CCA	CTG	AGG	GGA	GAG	GAC

LH4	C	T	A	G	C	C	G	A	C	G	T									
CG5	TGC	GCC	CCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACC	TCT	TG-	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CGA	GCT	CAC	CCC
CG6	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CGA	GCT	CAC	TCC
CG7	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CCA	GCT	CAC	TCC
Endo	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CCA	GCT	CAC	TCC

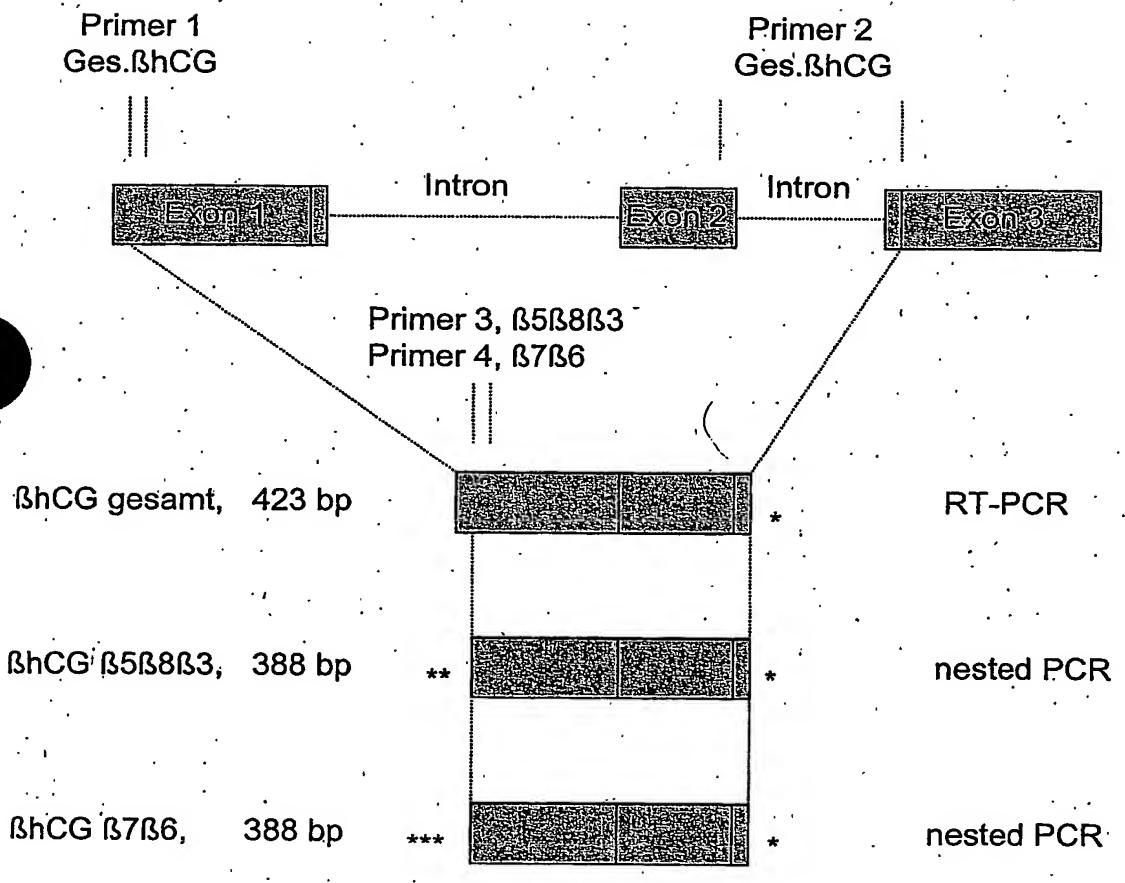
LH4	G	TC	C	TA TAA
CG5	AG-	CAT CCT <u>ACA</u> ACC TCC TGG TGG CCT <u>TGC</u> CGC CCC CAC AAC CCC GAG GTA <u>TAA</u> AGC CAG		
CG6	AG-	CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT TGC CGC CCC CAC AAC CCC GAG GTA TGA AGC CAG		
CG7	AG-	CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT TGA CGC CCC CAC AAA CCC GAG GTA TAA AGC CAG		
Endo	AG-	CAT CCT ACA ACC TCC TGG TGG CCT <u>TGC</u> CGC CCC CAC AAA CCC GAG GTA TAA AGC CAG		

LH							leu													
hCG							met	glu	met	phe	gln	*****	Intron	*****						
LH4	A	G		T						C										
CG5	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG	GTA	AGA	CTG	CAG
CG6	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						
CG7	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						
Endo	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						

LH *** * *** * *** * *** gly leu leu leu leu leu leu leu ser met gly gly ala
 hCG *** * *** * *** * *** gly leu leu leu leu leu leu leu ser met gly gly thr trp ala
 LH4 TTG TCC CAG GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
 CG5 G
 CG6 A
 CG7 A
 Endo GGG CTG CTG CTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
 +16 +30 +60

LH 90 120
 hCG glu gly cys pro val cys ile thr val asn thr thr ile cys ala gly tyr cys pro thr Primer 2
 LH4 CG5 GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
 CG6 CG7
 Endo GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC +150 +180

LH	Primer 2	ala	pro	390	417
hCG	arg val leu gln	gly val leu pro	ala leu pro gln val val cys	thr	
LH4		C	C	asn tyr arg asp	...
CG5	GGG GTC CTG CCG CAG	GGG GTC CTG CCG	GCC CTG CCT CAG	GTG GTG TGC	AAC TAC CGC GAT
CG6A	G	G	GTG	TGC	A
CG6B	G	G			A
Endo	CGC GTG CTG CAG	GGG GTC CTG CCG	GCC CTG CCT CAG	GTG GTG TGC	AAC TAC CGC GAT
	+210				+240



Primer 1: 5' - TCA CTT CAC CGT GGT CTC C - 3' β hCG ges.

Primer 2: 5' - NED - TGC AGC ACG CGG GTC ATG GT - 3' β hCG ges.

Primer 3: 5' - HEX - GGA CCA GTG AGA GGA GAG GG - 3' β hCG β 5 β 8 β 3

Primer 4: 5' - 6FAM - AGA CCA CTG AGG GGA GAG GA - 3' β hCG β 7 β 6

Patentansprüche

- 1) Verfahren zum Erkennen von Karzinomen, dadurch gekennzeichnet, daß einem Patienten Gewebe entnommen wird, dieses nach einer Homogenisierung einer Trizol-RNA-Extraktion unterzogen wird, sich eine RT-PCR am Thermocycler mit einem fluoreszenzmarkierten Primerpaar anschließt, die Gesamt- β -hCG-Expression über Exon 1, Exon 2, Exon 3 erfaßt wird, sich eine nested PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den β 7, β 6- und den β 5, β 8, β 3-Anteil anschließt, das cDNA-Amplifikat fluoreszenzvermessen wird, die Messwerte in Beziehung gesetzt werden durch den Quotienten aus hCG β 5, β 8, β 3 und hCG β 7; β 6 plus hCG β 5, β 8, β 3, wozu die Software von Genescan benutzt werden kann.
- 2) Verfahren zum Erkennen von Karzinomen, dadurch gekennzeichnet, daß einem Patienten Gewebe entnommen wird, dieses nach einer Homogenisierung einer Trizol-RNA-Extraktion unterzogen wird, sich eine Real time-RT-PCR mit den Methoden SYBR Green I, TaqMan, FRET oder Beacon anschließt, die Gesamt- β hCG-Expression über Exon 1, Exon 2, Exon 3 sowie die Expression der β hCG-spezifischen β 7, β 6- und β 5, β 8, β 3-Anteile mit Real time-RT-PCR in absoluter Quantifizierung der Kopienzahl in Bezug zur internen β hCG-Kalibratoren erfaßt wird, die Meßwerte in Beziehung gesetzt werden zu normalem und neoplastischen Gewebe, wozu die Software der Real time-RT-PCR benutzt werden kann.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die fluoreszenzmarkierten Primer 1 bis 4 entsprechend Sequenzprotokoll SEQ ID NO 1 bis NO 4 eingesetzt werden.

- 4) Verfahren nach den Ansprüchen 1) und 3) dadurch gekennzeichnet, daß die Primer nicht begrenzt sind auf diese genannten Primer vom Exon 1 des β hCG-Gens.
- 5) Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß nichtmarkierte Primer 1 bis 4 entsprechend Sequenzprotokoll SEQ ID NO 1 bis 4 eingesetzt werden.
- 6) Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer nicht begrenzt sind auf diese genannten Primer vom Exon 1 des β hCG-Gens.
- 7) Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Uteruskarzinomen einer Patientin Gewebe von Endometrium oder Zervix entnommen wird.
- 8) Verfahren nach Anspruch 1 zum Erkennen von Chorionkarzinom dadurch gekennzeichnet, daß die Fluoreszenzwerte für die Genexpression des β hCG $\beta 5$ und β hCG $\beta 7$ ermittelt werden, der Quotient von β hCG $\beta 7$ durch die Summe von β hCG $\beta 5$ und β hCG $\beta 7$ gebildet wird und die Höhe des Quotienten den Grad der Bösartigkeit des Tumors erkennen lässt.
- 9) Verfahren nach Anspruch 2 zum Erkennen von Chorionkarzinom, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem beschriebenen Verfahren der Real time-RT-PCT unter absoluter Quantifizierung der mRNA-Expression von β hCG $\beta 5$ und β hCG $\beta 7$ im Tumorgewebe das Karzinom erkannt wird.
- 10) Verfahren zur Prognose von Karzinomen nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle eines Colonkarzinoms, Mammakarzinoms oder Prostatakarzinoms oder weitere Karzinome der Quotient von β hCG $\beta 7$ durch die Summe von β hCG $\beta 7$ und β hCG $\beta 5$ gebildet wird und die Aussage getroffen wird, daß sich mit wachsendem Quotienten die Überlebenschance des Patienten mindert.

11) Testkit für ein Verfahren zum Erkennen von Karzinomen, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile enthält:

7

Reaktionslösungen	Ingredienzien
1. Primer 1	nicht-markierter Primer 1
2. Primer 2	fluoreszenzmarkierter Primer 2
3. Primer 3	fluoreszenzmarkierter Primer 3
4. Primer 4	fluoreszenzmarkierter Primer 4
5. RT-Reaktionsmix	RT-Reaktionspuffer mit dNTPs, Oligo-pdT15, RNase-Inhibitor für cDNA-Bildung
6. Reverse Transkriptase	Stammlösung für RT
7. PCR-Reaktionsmix	PCR-Reaktionspuffer
8. PCR-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase
9. nested PCR-Reaktionsmix	nested PCR-Reaktionspuffer

12) Testkit zur Durchführung eines Verfahrens zum Erkennen von Karzinomen, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile enthält:

Reaktionslösungen	Ingredienzien
1. Primermix A (β hCG β 5)	Primer 3 und Primer 2, beide unmarkiert
2. Primermix B (β hCG β 7)	Primer 4 und Primer 2, beide unmarkiert
3. RNA Kalibrator (β hCG β 5)	Stammlösung oder fünf Konzentrationen mit logarithmischer Kopienzahl
4. RNA Kalibrator (β hCG β 7)	Stammlösung oder fünf Konzentrationen mit logarithmischer Kopienzahl
5. RT-Reaktionsmix	RT-Reaktionspuffer dNTPs, Oligo-pdT-15, RNase-Inhibitor für cDNA-Bildung
6. Reverse Transkriptase	Stammlösung
7. PCR-Reaktionsmix	PCR-Reaktionspuffer mit SYBR Green- oder Hybridisierungsmix
8. PCR-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase

13) Verwendung des Testkit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von β hCG β 5- Genexpression zur Gesamt-Genexpression von β hCG β 7 und β hCG β 5 durch nested PCR-Amplifikation von verschiedenen fluoreszenzmarkierten β hCG β 5- und β hCG β 7- Produkten nach vorausgegangener RT-PCR der Gesamt β hCG-Expression vermessen wird und die β hCG-Genexpression dabei jeweils über Exon 1, Exon 2 und Exon 3 erfaßt wird, wobei die Fluoreszenzmessung am DNA Sequencer ABI 373A erfolgt und die quantitative Auswertung mit der Software Genescan 672 Fragment Analysis durchgeführt wird.

Literatur

- (1) J.C.Pierce, T.F.Parsons, *Annu.Rev.Biochem.*, **50** (1981) 465-495
- (2) P.A.Rothman, V.A.Chao, M.R. Taylor, R.W.Kuhn, R.B.Jaffe und R.N.Taylor, *Mol.Reprod.Dev.*, **33** (1992) 1-6
- (3) S.Dirnhofer, M.Hermann, A.Hittmair, R.Hoermann, K.Kapelari und P.Berger, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **81** (1996) 4212-4217
- (4) Z.M.Lei, P.Toth, C.V.Rao und D.Pridham, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **77** (1993) 863-972
- (5) T.Yokotani, T.Koizumi, R.Taniguchi, T.Nakagawa, T.Isobe, M.Yoshimura, N.Tsubota, K.Hasegawa, N.Ohsawa, S.Baba, H.Yasui und R.Nishimura, *Int.J.Cancer*, **71** (1997) 539-544
- (6) P.Berger, W.Kranewitter, S.Madersbacher, R.Gerth, S.Geley und S.Dirnhofer, *FEBS Lett.*, **343** (1994) 229-233
- (7) I.Marcilliac, F.Troalen, J.-M.Bidart, P.Ghillani, V.Ribrag, B.Escudier, B.Malassagne, J.P.Droz, C.Lhomme, P.Rougier, P.Duvillard, M.Prade, P.-M.Lugagne et al., *Cancer Res.*, **52** (1992) 3901-3907
- (8) H.Alfthan, C.Haglund, J.Dabek und U.H.Stemman, *Clin.Chem.*, **38** (1992) 1981-1987
- (9) V.Lazar, S.G.Diez, A.Laurent, Y.Giovangrandi, F.Radvanyi, D.Chopin, J.M.Bidart, D.Bellet und M.Vidaut, *Cancer Res.*, **55** (1995) 3735-3738
- (10) P.N.Span, C.M.G.Thomas, J.J.Heuvel, R.R.Bosch, J.A.Schalken, L.Locht, E.J.B.M.Mensink und C.G.J.Sweep, *J.Endocrinol.*, **172** (2002) 489-495

(11) M.Lundin, S.Nordling, J.Lundin, H.Alfthan, U.-H.Stenman und C.Hagund, *Int.J.Cancer*, **95** (2001) 18-22

(12) K.Hotakainen, B.Ljungberg, A.Paju, T.Rasmuson, H.Halthan und U.-H.Stenman, *Brit.J.Cancer*, **86** (2001) 185-189

(13) D.S.Hoon, T.Sarantou, F.Do, D.D.Chi, C.Kuo, A.J.Conrad, P.Schmid, R.Turner und A.Guiliano, *Int.J.Cancer*, **69** (1996) 369-374

(14) M.Bo und I.J.Boime, *J.Biol.Chem.*, **267** (1992) 3179-3184

(15) K.Talmadge, N.C.Vamvakopoulos und J.C.Fiddes, *Nature*, **307** (1984) 37-40

(16) P.Policastro, C.Ovitt, M.Hoshina, H.Fukuoka, M.R.Boothby und I.Boime, *J.Biol.Chem.*, **258** (1983) b11492-11499

(17) D.Bellet, V.Lazar, I.Bieche, V.Paradis, Y.Giovangrandi, P.Paterlini, R.Lidereau, P.Bedossa, J.-M.Bidart und M.Vidaut, *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523

(18) P.K.Hotakainen, E.M.Serlachius, S.I.Lintula, H.V.Halphan, J.P.Schröder und U.-H.E.Stenman, *Mol.Cell.Endocrinol.*, **162** (2000) 79-85

(19) A.K.Miller-Lindholm, C.J.Labenz, J.Ramey, E.Bedow und R.Ruddon, *Endocrinology*, **138** (1997) 5459-5465

(20) S.Madersbacher, C.Kratzik, R.Gerth, S.Dirnhofer und P.Berger, *Cancer Res.*, **54** (1994) 5096-5100

(21) R.Oyasu, L.Nan, P.Smith und H.Kawamata, *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **119** (1994) 715-717

(22) Y.Giovangrandi, B.Parfait, M.Asheuer, M.Olivi, R.Lidérau, M.Vidaud und I.Bieche, *Cancer Lett.*, **168** (2001) 93-100

(23) P.Chomczynski und N.Sacchi, *Anal.Biochem.*, **162** (1987) 156-159

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von Karzinomen, insbesondere von Uteruskarzinomen. Die Aufgabe besteht im Schaffen eines aussagesicheren und reproduzierbaren Verfahrens. Die Aufgabe wird gelöst, indem die mRNA-Expression von β hCG-Untereinheitengruppen Typ II (β hCG β 5, β 8, β 3) und Typ I (β hCG β 7, β 6) im Gewebe der Patienten derart vermessen wird, daß der Quotient von β 5, β 8, β 3 durch β 7, β 6 plus β 5, β 8, β 3 gebildet wird, wobei ein Wert nahe 1 neoplastisches Gewebe indiziert.

Ebenso kann die Aufgabe durch die Erfassung der absoluten Kopienzahlen für die Genexpression von β hCG β 5, β 8, β 3- und β hCG β 7, β 6-Amplifikaten durch quantitative Real time-RT-PCR im Tumorgewebe gelöst werden.

hCG (humanes Choriongonadotropin)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.